

機関番号：14101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780246

研究課題名（和文）飼料に発生するカビ毒の潜在性評価とサイレージ発酵における挙動解明

研究課題名（英文）The characteristics of deoxynivalenol in silage fermentation

研究代表者

近藤 誠 (MAKOTO KONDO)

三重大学・大学院生物資源学研究科・助教

研究者番号：50432175

研究成果の概要（和文）：

*Fusarium graminearum*が産生するカビ毒であるデオキシニバレノールについて飼料調製段階における挙動を検証した。デオキシニバレノールは、弱酸性～中性では安定であるが、弱塩基性では濃度が減少することが認められた。また*F. graminearum*の孢子および培養物を添加してサイレージを調製した結果、サイレージ中で新たにデオキシニバレノールが産生された可能性は低いことが推察された。

研究成果の概要（英文）：

This research focused on the characteristics of deoxynivalenol (DON) during silage treatment. As preliminary experiment, stability of DON in different pH solution was tested. The results showed that DON was stable in mild acidic and neutral solution but reduced clearly in mild basic solution. To evaluate the characteristics of DON during silage, spores of *F. graminearum* or molded maize grain by *F. graminearum* was added to whole-crop maize and ensiled for 30day. It was revealed that DON concentration was not changed during ensiling and 7 days after ensiling among these treatments.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：飼料学，動物栄養学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・畜産学・草地学

キーワード：飼料調製，サイレージ，デオキシニバレノール，*Fusarium graminearum*

1. 研究開始当初の背景

カビ毒は人や動物に対して強力な毒性を有する化合物であり、*Aspergillus* 属や *Fusarium* 属、*Penicillium* 属などのカビ毒産生菌とそのカビ毒であるアフラトキシンやフモニシン、DON、パツリンなどが見つかっている。

カビが発生した飼料を給与すると、家畜が下痢等を発症するほか、カビ毒による障害の発生も懸念される。また、カビが顕著に発生し

た飼料は破棄することになり、経済的な損失にも繋がる。国内では平成 17 年から自給飼料とカビ毒の発生について調査が始まり、国内のトウモロコシサイレージでは *Fusarium* 系のカビ毒が 18 サンプル中で 100% という確率で含まれることが明らかとなり、潜在的にカビ毒に汚染されていることが示唆された。中でも *Fusarium graminearum* が産生するデオキシニバレノール (DON) は、トウモロコシ

サイレージで90%近く含まれており、その毒性と存在確立が高いことから、そのサイレージ中での挙動を明らかにすることは学術面、産業面双方にとって重要である。

一般にサイロ内の嫌気環境ではカビの生育は抑えられるが、貯蔵の初期段階で残存している酸素がカビ毒の産生に及ぼす影響は不明であり、一方でトレンチ型のサイロでは、貯蔵過程においても終始カビ毒産生菌が検出されることが報告されている。また pH の低下がカビ毒の産生を誘導する例もあり、サイレージ発酵の初期におこる pH 低下がカビ毒を産生の促進に関わるかは未解明である。さらに栽培中に作られたカビ毒は、カビが死滅した後も残存するが、このカビ毒のサイレージ発酵中での変化については未解明な部分が多い。

2. 研究の目的

本研究では、汚染頻度が高い *Fusarium graminearum* とそのカビ毒であるデオキシニバレノール (DON) を対象に、飼料作物のポストハーベスト (収穫後～サイレージ調製) の段階を想定し、DON 汚染の発生条件や挙動を実験的環境下で明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験 1) 異なる pH 環境下におけるデオキシニバレノールの安定性

標品のデオキシニバレノール (終濃度 10 ppm) を pH の異なる溶液に溶解し、30°C で 5 日間インキュベートし、それらの溶液に残存するデオキシニバレノールを HPLC-PDA にて定量した。HPLC による分析は、カラム: ODS (内径 4.6mm, 長さ 25cm, 粒径 5 μm), カラム槽温度: 40°C、溶離液: 水-メタノール-アセトニトリル (18-1-1)、流速: 1 mL/min、検出: 220 nm とした。

実験 2) *Fusarium graminearum* を接種したトウモロコシサイレージ中のデオキシニバレノール濃度変化

トウモロコシサイレージへの *F. graminearum* の接種方法として、胞子のみと胞子を発芽させた菌糸を含む状態と 2 種類検証した。*F. graminearum* の胞子のみでの感染の影響を検証するため、マングビーン培地で *F. graminearum* を培養し、胞子形成を行い、胞子懸濁液を作成した。トウモロコシ 1 g あたりに付着する胞子数を 10⁴ になるように調整してトウモロコシに添加し、サイレージ調製を行った。また、滅菌したトウモロコシ穀実に *F.*

graminearum を接種し、7 日間培養し、*F. graminearum* の培養物を作成した。*F. graminearum* が増殖したことを確認した後、トウモロコシに同培養物を 2% 混合し、サイレージ調製を行った。サイレージは 30 日間、25°C で貯蔵した。また、サイレージ調製における詰込密度の違いがサイレージ中の初期の酸素濃度に影響することが予想されるため、本実験では、低密度区 (420 g fresh matter (FM) /L) と高密度区 (700 g FM/L) を設けた。さらに、サイレージは開封後に酸素に触れるため、カビの増殖やデオキシニバレノールの産生に影響する可能性が考えられる。そこで、本実験では、高密度区について、開封後に 7 日間酸素に暴露し、同様にデオキシニバレノールの濃度を測定した。貯蔵前、および貯蔵 30 日目、開封後 7 日目のサイレージは、60°C 48 時間で乾燥後、1mm のメッシュを通過するように粉碎した後、デオキシニバレノールの測定に用いた。デオキシニバレノールの測定は、HPLC-PDA の検出限界を下回ったため、ELISA (Neogen 社 Veratox5/5) により行った。

4. 研究成果

実験 1) 異なる pH 環境下におけるデオキシニバレノールの安定性

飼料生産の場で想定される様々な pH 環境下において、デオキシニバレノールの安定性を検証した。その結果、植物中の pH で想定される弱酸性領域や中性領域では、デオキシニバレノールは安定しており、残存率は 95~100% であった。従って、サイレージで想定される弱酸性領域ではデオキシニバレノールは低減しないことが示唆された。一方、わら類のアルカリ処理に用いられる場合を想定した塩基性領域における残存性は、20~60% と低く、塩基性側で不安定な化合物であることが明らかとなった。続いて、塩基性溶液としてアンモニア、炭酸ナトリウムを 0.1M~0.5M に、水酸化ナトリウムを 0.01M~0.05M に調整し、各溶液中の安定性を検証した。その結果、デオキシニバレノールの残存率は、アンモニア水中では 32~70%、炭酸ナトリウム水溶液中では 9~35%、水酸化ナトリウムでは 1~18% といずれの溶液中でもデオキシニバレノールが減少することが明らかとなった。さらに、アンモニア水とデオキシニバレノールを反応させた場合に、本分析で用いた HPLC の条件においてクロマトグラム上に新たな 2 種類のピークがフロント側に検出された。これらはデオキシニバレノールが変化した化合物であると予想され、アンモニア水との反応により極性が

高くなっていると推察された。今後、これらの化合物の同定と毒性に関する検証を行う必要がある。

以上の結果より、デオキシニバレノールは、植物に由来する弱酸性領域では安定しており、飼料の化学的処理に伴う塩基性領域では不安定になることが認められた。

実験2) *Fusarium graminearum*を接種したトウモロコシサイレージ中のデオキシニバレノール濃度変化

サイレージ調製前のトウモロコシに含まれるデオキシニバレノール濃度は無添加や胞子を添加した場合、*F. graminearum* の培養物を添加した場合のいずれにおいても、乾物中0.3~0.4 ppmであった。一方、それらを30日間サイレージとして発酵させた場合では、無添加区、胞子懸濁液を添加した区、トウモロコシ穀実の *F. graminearum* 培養物を添加した区において、0.7~0.9 ppm まで上昇し、各処理における有意な差は認められなかった。本実験では、サイレージの調製前後でデオキシニバレノールの濃度が上昇したことから *F. graminearum* がサイレージ中でデオキシニバレノールを産生する可能性が示唆されたが、対照区として用いた無添加のサイレージでも同様にデオキシニバレノール濃度が上昇していた。そこで、対照区における貯蔵前から貯蔵30日の変化量と胞子添加区あるいは培養物添加区の同変化量を比較した結果、いずれの処理区も対照区と同程度であったことから、サイレージ中で新たにデオキシニバレノールが産生された可能性は低く、サイレージの発酵が進み pH が低下したことが、測定に用いた ELISA の反応に影響した可能性も考えられた。今後、HPLC-質量分析計を用いて低濃度のデオキシニバレノールを検出することで、デオキシニバレノールのサイレージ中におけるより詳細な検証を行う必要がある。

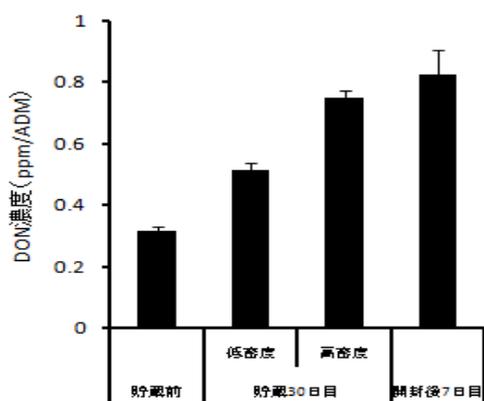


図 1. トウモロコシサイレージの発酵過程におけるデオキシニバレノール濃度（無添加区）

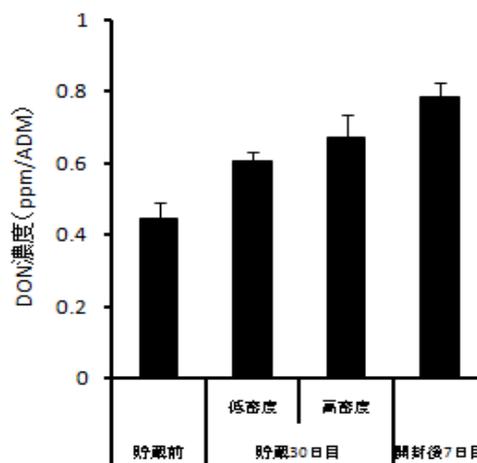


図 2. トウモロコシサイレージの発酵過程におけるデオキシニバレノール濃度（*F. graminearum* 胞子添加区）

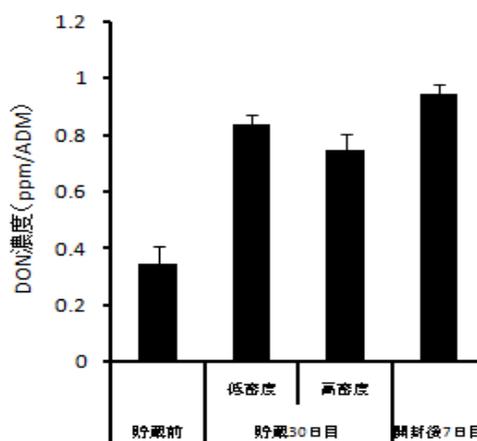


図 3. トウモロコシサイレージの発酵過程におけるデオキシニバレノール濃度（*F. graminearum* を培養したトウモロコシ穀実を添加した区）

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計2件）

①Uddin MK, Kondo M, Kita J, Matsui H, Karita

S, Goto M. Effect of supplementation of soy sauce cake and vinegar brewer's cake with total mixed ration silage-based diet on nutrient utilization by Holstein steers. Journal of Food, Agriculture & Environment 8: 282-287 (2010) 査読有

②Uddin MK, Kita J, Hiraoka H, Kondo M, Karita S, Goto M. Effects of brewer's by-product on the fermentation quality of ensiled total mixed ration. Journal of Food, Agriculture & Environment 7: 804-810 (2009) 査読有

[学会発表] (計 3 件)

①Uddin MK, Kondo M, Kita J, Matsui H, Karita S, Goto M. Effect of soy sauce cake and vinegar brewer's cake with total mixed ration silage on in vitro and in vivo rumen fermentation. 14th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. Pingtung, Taiwan. 2010 年 8 月 25 日

②石崎雄介, 磯和祐太, 川原田直也, 川村淳也, 鈴木令央奈, 平岡啓司, 前橋善浩 2, 神田幸英, 松井宏樹, 荻田修一, 後藤正和, 藤原 勉, 近藤 誠. 小麦ホールクロップおよび小麦わらサイレージの発酵品質と in vitro ルーメン内における分解特性. 第 66 回日本草地学会. 三重大学. 2009 年 3 月 26 日

③Uddin MK, Kondo M, Takahashi Y, Karita S, Goto M. Growth of *Aspergillus flavus* on total mixed ration and its silage used as medium. 第 66 回日本草地学会. 三重大学. 2009 年 3 月 26 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

近藤 誠 (MAKOTO KONDO)

三重大学・大学院生物資源学研究科・助教
研究者番号 : 50432175

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし